

DELPHION**RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**
[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)
[My Account](#)

Search: Quick/Number Boolean Advanced Der

The Delphion Integrated View: INPADOC RecordGet Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#)

Tools: Add to Work File: Create new Work

View: Jump to: Top

Go to: [Derwent](#)☒ EmailTitle: **GB2209757B: ALTERED ANTIBODIES**Derwent Title: Modified IgG class antibody - having at least one aminoacid residue in the constant portion altered to alter an effector function ([Derwent Record](#))

Country: GB United Kingdom

Kind: B (See also: [GB2209757A](#))Inventor: GREGORY PAUL * WINTER; 64 CAVENDISH AVENUE,CAMBRIDGE
ALEXANDER ROBERT * DUNCAN; 5 HARVEY ROAD,CAMBRIDGE
DENNIS RAYMOND * BURTON; 41 CARSICK HILL ROAD,SHEFFIELD S10Assignee: * MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 20 PARK CRESCENT,LONDON W1N 4AL, United Kingdom
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 1990-10-24 / 1988-11-01

Application Number: GB1988008825480

IPC Code: IPC-7: [A61K 39/395](#); [C12N 15/13](#);

ECLA Code: None

National Class: C3H0HB7M0000000000HB7MC3H0H6750000000000HB7MU1S0S2419

Priority Number: 1987-12-01 [GB1987008728042](#)INPADOC Legal Status: None Get Now: [Family Legal Status Report](#)

Designated Country: AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE AU EP GB JP US DE FR GB IT EP JP US

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
	WO8807089A1	1988-09-22	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
	WO8807054A1	1988-09-22	1988-03-18	COMPLEMENT-BINDING PEPTIDE
	US5648260	1997-07-15	1995-06-07	DNA encoding antibodies with altered eff functions
	US5624821	1997-04-29	1995-06-07	Antibodies with altered effector functions
	JP03101690B2	2000-10-23	1988-03-18	
	JP01502875T2	1989-10-05		
	GB8825480A0	1989-01-05		
	GB8825480A	1989-01-05	1988-11-01	ALTERED ANTIBODIES
	GB8728042A0	1988-01-06		

<input checked="" type="checkbox"/>	GB8728042A	1988-01-06	1987-12-01	ANTIBODY WITH ALTERED AFFINITY
	GB8718897A0	1987-09-16		
	GB8706425A0	1987-04-23		
<input checked="" type="checkbox"/>	GB2209757B	1990-10-24	1988-11-01	ALTERED ANTIBODIES
	GB2209757A1	1989-05-24		
<input checked="" type="checkbox"/>	GB2209757A	1989-05-24	1988-11-01	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	EP0351410A1	1990-01-24	1988-03-18	COMPLEMENT-BINDING PEPTIDE
<input checked="" type="checkbox"/>	EP0307434B2	1998-07-29	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	EP0307434B1	1993-09-08	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	EP0307434A1	1989-03-22	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	DE3883899T3	1999-04-22	1988-03-18	GEAENDERTE ANTIKOERPER.
<input checked="" type="checkbox"/>	DE3883899T2	1994-03-31	1988-03-18	GEAENDERTE ANTIKOERPER.
	DE3883899C0	1993-10-14	1988-03-18	GEAENDERTE ANTIKOERPER.
<input checked="" type="checkbox"/>	AU1480388A1	1988-10-10	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	AU0600575B2	1990-08-16	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	AT0094171E	1993-09-15	1988-03-18	GEAENDERTE ANTIKOERPER.
25 family members shown above				

Forward
References:

Go to Result Set: Forward references (1)

PDF	Patent	Pub.Date	Inventor	Assignee	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	US7053202	2006-05-30	O'Keefe; Theresa L.	Millennium Pharmaceuticals, Inc.	Immunoglobulin DNA c molecules, monobody c methods of production, : methods of use therefor

Other Abstract
Info:

CHEMABS 110(23)207251T CHEMABS 111(17)151930Q DERABS C88-285516 DER/285543



Nominate this for the Gallery...

Copyright © 1997-2006 The Thor

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact U](#)

⑤ 日本国特許庁(JP)

⑥ 特許出願

⑦ 公表特許公報(A)

平1-5

⑧ 公表 平成1年(1989)

⑨ Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分)
C 12 P 21/00 A 61 K 39/395 C 07 K 15/08		C-6712-4B V-8829-4C 8318-4H※			

⑩ 発明の名称 変性抗体の、または変性抗体に関する改良

⑪ 特 願 昭63-502461
⑫ 出 願 昭63(1988)3月18日

⑬ 翻訳文提出日 昭63(1988)11月
⑭ 国際出願 PCT/GB88/002
⑮ 国際公開番号 WO88/07089
⑯ 国際公開日 昭63(1988)9月

優先権主張 ⑰ 1987年3月18日 ⑱ イギリス(GB) ⑲ 8708425

⑳ 発 明 者 ウインター、グレゴリー・ポール イギリス、ケンブリッジ カベンディッシュ・アベニュー、6
㉑ 発 明 者 ダンカン、アレクサンダー・ロバート イギリス、ケンブリッジ ハービー・ロード、5
㉒ 出 願 人 メディカル・リサーチ・カウンシル イギリス、ダブリュ・1・エヌ 4・エイ・エル、ロンドン
㉓ 代 理 人 弁理士 塚見 久郎 外2名
㉔ 特 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. 応答部分(本明細書で定義する)中の少なくとも1つのアミノ酸残基が、非変成抗体と比較して抗体のニフェクター機能を変性する異なる残基により置換されたクラス1 g Gの変成抗体。

2. 抗体がエフェクター分子に対する凝集性を非変成抗体と比較して変性した請求項1の抗体。

3. 抗体が正常抗体、モノクローナル抗体または多価抗体である請求項1の抗体。

4. 非変成抗体と比較してFcレセプターに対して変性した結合親和性を備えた変性Fc領域を有するクラス1 g Gの変成抗体。

5. 非変成抗体と比較してFcγR1レセプターに対し

7. 残基285がG10により置換された請求項6の抗体。

8. 残基234、286および237の少なくとも1つがG10により置換された請求項6の抗体。

9. 非変成抗体と比較してC1qに対して変性した結合親和性を備えた変性Fc領域を有するクラス1 g Gの変成抗体。

10. 残基のアミノ酸残基18、320および322の少なくとも1つが、異なる側鎖を有する残基に代わった変性C2領域を有する請求項9の抗体。

11. 残基318、320および322の少なくとも1つがC1q結合親和性を減少するA1aに代えた請求項10の抗体。

12. 残基218がV21に代わった請求項10の抗体。

13. 残基322がQ1nに代わった請求項10の抗体。

域を有する請求項15の抗体。

16. 図29AがA1エにより置換された請求項15の抗体。

17. びっ歯類またはヒトIgGからなる請求項1の抗体。

18. 変換部分(本明細書で定義する)の少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基で置換し、抗体のエフェクター機能を非変換抗体と比較して顕著することからなるエフェクター分子に対するクラスIgGの抗体のエフェクター機能を喪失する方法。

19. (a) IgH鎖またはH鎖の変換部分の少なくとも一部をコード化し、かつ少なくとも1つのアミノ酸残基が変換抗体中の対応する残基と異なるDNA配列に作動可能に結合した適切なプロモーターを含む第一の複製可能な表現ベクターを生成し;

(b) 必要により、相補的IgL鎖またはL鎖をコード化するDNA配列に作動可能に結合した適切なプロモーターを含む第二の複製可能な表現ベクターを生成し;

(c) 第一または第二の表現ベクターを有する細胞系を構築して;

(d) 前記構築した細胞系を培養して変換抗体を生成す

明 細 書

変換抗体の、または変換抗体に関する改良

発明の分野

本発明は変換抗体に関し、変換したエフェクター機能を有する抗体、該抗体を産出する方法、および抗体のエフェクター機能を喪失する方法に関する。

発明の背景

抗体、即ち免疫グロブリンは、ジスルフィド結合により連結された二つのH (heavy)鎖と、二つのL (light)鎖からなり、各鎖は各々のC領域にジスルフィド結合により結合している。IgGクラス(すなわち、ガンマ(G)クラスの免疫グロブリン(Ig))の抗体の一般構造を添付の図1図に模式的に示す。

各鎖は一対に一つの可変領域を有し、これに幾つかの定常領域が連なる。各鎖は一対に一つの可変領域を、他鎖に一つの定常領域を有し、L鎖の可変領域はH鎖の可変領域と隣接し、L鎖の定常領域はH鎖の最初の定常領域と隣接する。

る

工程からなる変換抗体に比較して改良したエフェクター機能を有するクラスIgGの抗体を生成する方法

えて伸びるH鎖の部分により構成されたFc領域に

抗体は、エフェクター分子の結合を媒介としてエフェクター機能を有する。例えば、補体のC1成分の誘発結合は補体システムを活性化する。補体の活性化は作用および細胞傷害の過程において重要な補体の活性化は炎症反応を誘起し、免疫応答の誘起を引き起こす。さらに、抗体は、抗体Fc領域上セプター部位を細胞上のFcレセプター(FcR)でFc領域を介して細胞に結合する。IgG(ガンター)、IgE(イグレセプター)、IgA(アセプター)およびIgM(ミューレセプター)を含むクラスの抗体に対して特異的なFcレセプターを有する。細胞表面のFcレセプターに対する抗体の抗体凝集粒子の食作用(eagulfosis)および破壊、その消化、マクロ細胞による抗体被覆した細胞の細胞内体消化細胞障害(ADCC)と称される)、炎症、その放出、胎盤トランスファーおよび免疫グロブリンの細胞を介したその作用で多様な免疫学的効果

提供され、ここで少なくとも一つの定常型のアミノ酸残基(本明細書にて炭素)は異なる位置により置換され、抗体のエフェクター機能を未成熟の抗体に比較して減低する。

抗体のエフェクター機能は減低、すなわち、Fcレセプターまたは補体成分のようなエフェクター分子に対する抗体の親和性の強化または減少により変換してよい。結合親和性は一般的にエフェクター分子の結合部位を突触することにより度わり、この場合では、開鎖の部位の位置を調整し適切な方法で該部位の少なくとも一部を突触するのが好ましい。また、エフェクター分子に対する抗体上の結合部位における変性は、全体的な結合親和性の減低を実質的に必要としないが、幾何学的な相互作用を減え、エフェクターの順序を非生産的結合によって阻害するものとするところがあることも考えられる。さらに、またエフェクター機能は、エフェクター分子結合に直接に関連せず、エフェクター機能の発現に関連する部位を突触することにより減低してよいと考えられる。

抗体のエフェクター機能を変換することにより、免疫反応の様々な面を制御すること、例えば、免疫系の様々な反応を強化または抑制することが可能となり、診断および治療において有益な効果が得られる。

例えば、腫瘍および癌のガンなどのような幾つかの悪性性腫瘍を有する患者の癌性腫瘍の誘導的局在化(guided localization)をはかるためにモノクローナル抗体を用いることが知られている。しかしながら、これらの一般の用途は、

を越す。

変換抗体の産生は、新産物に未知の技術を含むいかなる適当な技術によって行なってもよい。例えば、C_H2領域などの抗体の関連した正常領域の形成部または全部など、抗体の適当なタンパク質配列は、適当な変性残基を含んで合成することができ、ついで抗体分子の適当な場所に化学的に結合することができる。

しかしながら、遺伝子工学の技術を変性抗体の産生に用いるのが好ましい。変性すべきかかこのような技術はつぎのものからなる。

- 適当な残基が変性されたIgG 重鎖のIgGのV_H、C_H1、C_H2領域など、IgG H鎖またはH鎖の少なくとも一部をコード化するDNA配列には操作可能に結合した適当なプロモーターを含む第一の複製可能な表現ベクター(expression vector)を産生すること。
- 必要により、相補的Ig L鎖またはH鎖をコード化するDNA配列に操作可能に結合する適当なプロモーターを含む第二の複製可能な表現ベクターを産生すること。

公認性、毒性並びに非特異的毒性のようないくつかの困難が広がっているため、限定されている。人体への内投与後、その阻害となる組織に到達する放射性同位素(または腫瘍結合(isotop associated)モノクローナル抗体)少量である(Epsteinら、1986年)。これらの研究における一つの問題として、正常なリンパ節における高い非特異性、およびネズミモノクローナル抗体の速やかな異化が、また、ヒトモノクローナル抗体の使用は、リンパ管、肝および脾臓の高親和性レセプター(FcγR1)に対する非特異的結合のため高い背景レベル(バックグラウンド)を示すことがある。この高親和性レセプターに結合しないモノクローナル抗体は、抗体の特異的な腫瘍への取り込みを増大し、一方FcRへの非特異的結合により背景レベルを下げることにより抗体誘導(induced)腫瘍の局在化を改める。腫瘍の治療に用いられるモノクローナル抗体は、一般的には放射性の標識がなされるか、ホスト自身のニームの順序の利用が行われる。単独療法、特にK細胞によるDCは最も効果的と思われる(301ら、1985年)が、抗腫瘍した細胞細胞によって生体内でこれらのいずれが最もであるかは未だ明らかでない。ある形式のFcレセプターに反応する抗体を産生することは可能である。例えば、B、Sの細胞の高親和性FcγR1を結合しない抗体は産生され得るが、従前に提案したとFcγR1を結合し、ADCCおよび細胞毒性の特異的破壊

クターを用いて形質転換された細胞系、プレパラティブ(preparative)ベクターを用いて形質転換された細胞系、およびそれらを産生する方法を含む。

好ましくは形質転換され変性されたエフェクター機能性を産生する細胞系は、不死化した哺乳動物の細胞系でこれはミエローマ、ハイブリドマ、トリオマまたはドコモマ細胞系のごときリンパ系器官という利点を有すまた、細胞系はエプスタインバーウイルスのごときウイルスを用いた形質転換により不死化されたB細胞など常なリンパ細胞からなってもよい。最も好ましくは該不細胞系はミエローマ細胞系またはその派生体である。

変性したエフェクター機能の抗体を産生するのに用いる細胞系は哺乳動物の細胞系であるのが好ましいが、細胞系または酵母細胞系のごとき他のいかなる適当な宿主かわりに用いてもよい。特に、E.coli 誘導細胞系を用いることも考えられる。

正常状態にあるある種のミエローマ細胞系のごとき不したリンパ細胞系は、分離したIg L鎖を分泌すること

恒定的な鎖を分泌しない場合、ステップc)を実行する必要がある。このステップはステップb)において発生されたベクターをさらに操作することにより行なってもよく、その結果このベクターは異質だけでなく宿主をコード化する。別態としては、不死化した細胞系を形質転換するのに用いられる第二ベクターを産生することによりステップb)を実行する。

かかるベクターを産生し、不死化した細胞系を形質転換に用いられる技術は、当業者に公知であり本発明を構成するものではない。

不死化した細胞系が恒定的な鎖を分泌する場合において、形質転換された細胞系は例えばベクターを用いて適当な細胞の細胞を形質転換し、ついで該細胞の細胞を不死化した細胞系を用いてスフェロプラスト融合により融合して産生してよい。別態としてリトムを直接不死化した細胞系にエレクトロポレーション(electroporation)により導入してもよい。

抗体の関連抗原タンパク質をコード化するDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成により産生してよい。別態として産生したタンパク質をコード化するDNAをプライマー-定方向オリゴヌクレオチド部位-定方向突然変異誘発により産生してもよい。この技術は本発明に既知点を含有するDNAの一本鎖を用いて所定の基盤に対してコードするオリゴヌクレオチドのハイブリッドを形成すること、および産品を含む鎖を産生するオリゴヌクレオチドの延長のために機能として一本

鎖を用いることを含む。この技術は、様々な形で記述されている[ZollerおよびSelik(1982年)、Zollerおよび984号)、Norris(1983年)、Kraemer(1982年)]

最も単純な形態のこの技術は、様々な理由から高い頻度で変異を生じない、M13に基づくベクター-単一および融合配列の両方を誘導する改良技術(C985a)により報告されている。

本発明は、異なる種、例えばヒト、げっ歯類(マウス、ハムスター)など、および他の種(class)の行うことができる。本発明はまた自然発生産品、例(例えばPCT/GB85/60392にて開示の形式の)他の方法(GB2168538にて開示の形式の)にて変性転換に用いることができる。

一例として、IgGについてFcガンマR1とヒトレセプターに結合する結合能性を変える研究がなされ

ヒトおよびマウスにおいて、3種のFcガンマR1は部分的にFcガンマR1、FcガンマR1b、FcガンマR1cと呼ばれ、これらは全く異なって産生される細胞型(bone-marrow cell type)を産生する(およびLoney、1988年)。さらに、これらレセプターはIgGサブクラスに対して異なる結合能性を持つ。前記のごとく、細胞表面のこれらのレセプターへの結合は数々の異なる多様な生物学的反応を引き起こすなどのレセプターがどの効果に対して主に反応するか

は知られていないが、これら恒定的な作用に対して関連する恒定的レセプターであることが反応の形から推定される。ヒトおよびマウス中のレセプターは数々の発見的基盤に基づき同族体として提案されている。両者由来の恒定的レセプターFcガンマR1のクローニングおよび配列決定(sequence)は、この恒定的(Levyら、1986年)を支持する。恒定的レセプターFcガンマR1は広範囲にわたり、かつヒトとマウスの両方の結合単量体IgG(ヒト-IgGおよびIgG2b、マウス-IgG2a)について研究されており、同一の細胞型に発見される。

IgGのFc領域は、第1図に示すように二つの定常領域、C2およびC3からなる。マウス系を用いて、相互作用に対する二つの領域、Cガンマ3およびCガンマ3の互いの野の決定に多くの努力が払われた。分離されたC3領域(CpCフラグメント)は、免疫複合体の形成において阻害作用を示さないことが報告されている(Abrahamら、1976年)。しかし他の報告では、このフラグメントはFcガンマ

の能力は、IgG2b領域上の抗原決定基に向けられ結合したFcRと相互作用を行うが、C3上のRに結合していないものはC2領域上の結合部位と(Partridgeら、1983年)。

また、ヒト単量体FcガンマR1上のヒトIgG2b高親和性レセプターの広範な研究において、FoxらはヒトIgG1のC2領域に対する結合部位のを行った(Woodら、1984年; Partridgeら、1984年)から得られたIgGサブクラスの範囲はヒトプリンのフラグメントと共に、直接結合生物学においてヒトIgGとヒト単量体との間の相互作用を明らかにその能力がテストされた。IgGはヒト単量体(FcガンマR1)に対して強い、中間のあるいは弱く示すものに分類された。このような異なる親和性のアミノ酸配列の比較により、ヒンジ結合領域(45-50残基)の潜在的な単量体結合部位が、1316-1588により形成された二つのペプチド断片(1316-1588)の可溶性W4と

88) Leu-Leu-Gly-Gly-Proがマウスガンマ2b中のLeu-Gly-Gly-Proになることを示す。

結合親和性を調べる試みにおいて、G1u28のLeuによる置換がマウスIgG2bの可変域中に行われた。可変域中の残基の番号は、EUインデックスの番号である (Kabata, 1983年参照)。正常マウス抗体はヒトFcガンマR1に結合しないが、残基28をグルタミン酸からロイシンに例えば単位重方向変異誘発にて変えることにより、ヒトFcガンマR1に対する親和性は100倍以上増大する。親和性の増加の大きさは予想以上に大きく、この領域における単一のアミノ酸の置換が、ヒトおよび他の動物の生体内における適用領域に対してより適合した抗体抗体の生産に用いられることを示唆する。この置換は残基成分C1qなどの他のIg結合部位を活性しない。

また、特定の残基をその側鎖上の不適当な置換を有する残基で置換することにより、あるいはG1uまたはAspなどの異なる官能基、あるいはPro、TyrまたはTrpなどの芳香族非極性残基などを導入することによりFcガンマR1結合の親和性を高めることが可能である。

これらの置換は、異なる免疫グロブリンの間の配列の相似性が得られたマウス、ヒトおよびラット系に対し等しく適用されると予想される。ヒトFcガンマR1レセプターを結合するヒトIgG3において、Leu235をG1uに置換す

ることは、レセプターに対する抗体の相互作用を破壊することによりこのレセプターの結合部位はスイッチオン、オフが行われる。

ヒンジ連結領域 (例えばA1uによる置換残基234、235または237) の置換または置換部位における置換 (残基234、235、236および237における置換とFcガンマR1レセプターに対する親和性に少なくとも影響を与えることを示す。

したがって、本発明の他の観点では、示唆抗体と比べてFcガンマR1に対する抗体結合親和性を付えた抗体 (置換を有するクラスIgGの置換抗体が提供される。

このような抗体は、残基234、235、236および237に置換を有するのが都合がよい。

他のFcレセプターに対する親和性は異なる方法において免疫反応を制御するなどの用途の方法で活性することができる。

さらに他の例として、糖体のC1成分の結合によるIgの凝集性を活性することも研究された。

糖体系、C1の第一成分は実際にはC1q、C1rおよびC1sとして公知の3種類のタンパク質からなり、これら強く結合している。C1qは8種のタンパク質糖体の1の結合に対して正格性を有することがわかった。

分離されたFcフラグメントはC1qとIgとの相互作用を阻害することがわかった (Vasconcelos, 1976年)。

また、C1qの結合はイオン強度に依存し、イオン相互作用が関連することがわかった。

Cn3領域をIg分子の他の部分から切り取ることが可能であり、Cn3領域の欠失によってC1q結合活性はなくなるということがわかった (Coloan および Porter, 1975年)。

Cn2領域をIgGから分離することも可能である。このような分離Cn2領域は分離したFcフラグメントと同様にC1qに対して同一の結合親和性を有することがわかった (Ikenmeyer, 1975年)。

このような結果からC1qに対する結合部位はIgのCn2領域に位置すると推定される。C1q結合に参与するCn2領域中の特定のアミノ酸残基を特定するために様々な試みがなされた。最初の手法では、Cn2領域の短い部分に特定の合成ペプチドがC1q結合の阻止のために試された。これによって二つの可能な結合部位が特定された (Bookle, 1975年およびLukas, 1981年)。

第二の手法では、数種のIgCn2領域の配列の比較が、その三次元構造の研究と共に行われた。この結果、C1q結

H領域中の残基の番号はEUインデックスの番号である (Kabata, 1983年参照)。

本発明者らは、以下に述べる特異的なC1q結合 (G1u28, 318 (G1u), 320 (Leu) および321 (Asp) のいずれか一つの残基をA1uに変えることにより結合をなくすることが可能であることを見いだした。

さらに、これらの残基において変異を起こさせることにより、残基318が水素結合形成を有し、かつ残基320および321の両者が正に侵襲された例を有するものが、結合が保持されることがわかった。

本発明者らは、これらの三つの残基はIgGのC1q結合に直接関連するのであると信ずる。しかしながら、これらの残基はC1qとの物理的接触には直接関係しない性もある。これらの残基は一つのCn2領域が、IgG第2中の側鎖領域に対して変換するのを補助し、この結果C結合にとり必要な少なくとも二つのIgG分子を産生 (この場合、C1qは全く異なる領域中のIgGと置換抗体であってもよい。しかしながら、本発明者らはいず

抗原 B1B、320 および 322 は、細胞結合であるマウスおよびヒト IgG 中に高濃度に維持されることに注目すべきである。

また、3つの特定の糖基の脱糖は C1q 結合活性を促進するだけで、抗原結合能力、プロテイン A 結合活性（プロテイン A は C_μ2/C_μ3 インターフェースに結合する）または Fc のマウスマクロファージへの結合能力は減弱させないことがわかった。

本発明の方法は、3つの特定の糖基のいずれか1つをその側鎖上の不適当な糖基性を有する糖基で置換することにより C1q 結合活性をなくすことに用いることができると発明する。A1_μのみを有するイオン性糖基を C1q 結合で置換する必要はない。また、C1q 結合をなくするため、3つの糖基のいずれか1つの代わりに他の GlcNAc、Gal、Leu または Val などのアルキル置換非イオン性糖基、あるいは Phe、Tyr、Trp および Pro などの芳香族側鎖性糖基を用いることも可能である。また、C1q 結合活性をなくするために抗原 320 および 322（318 は除く）の代わりに Ser、Thr、Cys および Met のような極性非イオン性糖基を用いることも可能である。

イオン性または非イオン性糖基置換上の制限は GlcNAc 基により形成される結合と同様の方法で水素結合を形成することができる。したがって、糖基置換による 318（GlcNAc）糖基の置換は修正されてよいが、C1q 結合活性をなくすこ

とはない。

さらに A1_μ による 207（Asn）の置換はを除去し、一方 C1q に対する親和性を僅かだけ（約 1/3 に弱くなる）ことがわかった。これは 3 コンフル化部位を破壊するためであり、かつ液体中に炭化水素の存在が必要であると考えられる。こける他の置換いずれもグリコシル化部位を破壊する

さらに、Leu 320 の GlcNAc への置換は、C1q 結合活性を正常型に比べ僅かだけ弱くすることがある。これは良好な C1q 結合が溶解には不十分であり、I_μ の正確な配向が必要であることを示す。

現在までの全ての抗体インタイプは、マウス I 体に移植する場合、C1q 結合要素 (notif) または結合に協力的な部位に関連した変換を受ける。明の決定因子が他に存在するはずである。例えば、および低セグメント系糖基を有する抗体インタイプ（O1_μ、1984年）であり、（a）セグメントを C1q の相互作用は Pab_μ アームによる C_μ の固定のために立体的にブロックされる（Leatherbarrow 年）か、または（b）C1q と抗体との相互作用のために正確な配向を必要としこのためそれ自体異なり、要とすることが示唆される。

つぎに本発明を示す図面を参照し、実施例により、第1図は I_μ の構造を示す。

第2図は変換した P_μ ガンマ R1 結合活性の抗体を生成するために用いるクローニングステップの手順を示す。

第3図はマウス IgG ガンマ 2b 遺伝子の配列を示す。

第4図は U937 上の高親和性レセプターに対してマウスガンマ 2b 免疫グロブリンを用いて結合した¹²⁵I にて標識したプール (pooled) ヒト IgG の阻止を示すグラフである。

第5図は U937 高親和性レセプターに結合した¹²⁵I-¹²⁵I-¹²⁵I-¹²⁵I のスクリーンショットである。

第6図はヒトガンマ 3 遺伝子のヌクレオチド配列およびタンパク質配列を示す。

第7図は変換を有するマウス IgG 2b 抗体の C_μ2 領域をコード化するオリゴヌクレオチド配列、および残りの変換変異体を構成するために用いられるオリゴヌクレオチドの配列を示す。

つぎにヒト P_μ ガンマ R1 に対するその親和性を変換するマウス IgG 2b に関する実験について述べる。

抗体の可変および定常領域エクソンをコード化する DNA は、*in vitro* で操作し、リンパ細胞系中に再導入することが

な領域をコード化する。このベクターを用いて抗体はヒト P_μ ガンマ R1 に結合しない。

pSV-VNP 2b ベクターの構造の一部を示す。図 2(b) 図に示すごとく、各ベクターは用いて部分的に消化され、C_μ2 および C_μ3 の両方フラグメントはプラスミド M18K19 (Carte a) にクローンされる。

C_μ3 領域の N 末端の Ser1 部位は、この N 末端配列を保持したオリゴヌクレオチドを用いた変換変異誘発により除去された。

ついで、C_μ2 領域における点変異は、第3図に相対する 5'975 塩基および塩基 E1236 にて変換にて合成オリゴヌクレオチドを用いて生ずる。変異の構造は以下に述べる。点変異の置換を第2(す。

変異 C_μ2-C_μ3 フラグメントは pSV-VNP5 クター中にクローンされ、正常型 C_μ2-C_μ3 をする。変異体 pSV-VNP 2b ベクターは、J

抗原抗体反応235は、ヒトIgGの結合の抑制およびヒト単球細胞への直接結合により検定される(Toofら、1984; 1986)。ヒト単球細胞系、U937上の高親和性Fcγセプターへの抗原体の¹²⁵Iで標識した正常ブールヒトIgGの結合の抑制は、定量的な放射能学的検定システムにて測定され、ここで遊離あるいは固相結合標識は水-非親和性オイルを用いて遠心分離により分離された。正常型ガンマ2bおよび抗原抗体235の結合は、標識したポリクローナルヒトIgGの結合により比較される。第4図はこの実験の阻止曲線を示す。第4図において白丸は正常型を示し、黒丸は抗原抗体235を示す。結果は阻害剤(inhibitor)の存在下に¹²⁵I-IgGの結合分率=1となるよう標準化した。抗原抗体はヒトIgG1の結合を阻止し、正常型のタンパク質は阻止活性を示さなかった。放射性標識をした抗原抗体235のU937細胞への直接結合は、結合定数 $3.13 \times 10^8 M^{-1}$ を与え(第5図)、同様の実験のブールヒトIgGの値と非常に近接している。

第5図はU937高親和性Fcγセプターに結合する¹²⁵I-E1235の典型的なスキャッチャードプロットである。細胞のセル当たりの¹²⁵I-E1235結合のセル数、rはつぎの関係式を用いて計算した。

$$r = \frac{6 \times 10^{12} \times \text{IgG 2b}}{\text{細胞の数} \times L}$$

式中、IgG2bは結合¹²⁵I-E1235の濃度である。

第1表

	<u>I₅₀ (36)</u>
正常型 (Leu234, Leu235, Gly236, Gly237)	10 ⁻⁸
抗原抗体	
A1a236	4 × 10 ⁻⁸
G1u 235	10 ⁻⁸ 超
A1a236	8 × 10 ⁻⁸
A1a237	3 × 10 ⁻⁸

上記の表はI₅₀(即ち、¹²⁵Iで標識したブールヒトIgGの結合分率が0.5におけるIgG3の濃度)の概略を示す。

これらの結果は前記のごとく、診断および治療においてマウスおよびヒトの両抗体の使用に重要な意味を持つ。

この結果はFcγガンマR1セプターが選択的にスイッチオンまたはオフされることを示し、これは人および他の動物のin vivoの診断または治療に用いられる抗体の標識に大いに用い得ることを示す。

Aは遊離の¹²⁵I-E1235の濃度をあらわす。プロットの相関関係は0.95であった。

このように抗原抗体は、ヒトFcγガンマR1に対するIgG2bの結合親和性を100倍向上させる。

抗原はヒトガンマ3遺伝子下にて行われ(Duckら、1971)induced-SpH1フラグメントは、BamHIリンカ付着した後、最終にM13 mp10内にサブクローニングした。ついで、合成オリゴヌクレオチドが前記のごとく0.1第6図に示すごとく変異：

234 LeuからA1a

235 LeuからG1u

236 GlyからA1a

237 GlyからA1a

を形成した。

BamHIフラグメントは、B18抗体の可変領域にコード化するHindIII-BamHIフラグメントに付着し(Kuberserら、1984および1985に記載)、pSVgベクター中に発現するようにクローニングされる。

FcγガンマR1における結合の阻害性抗体の性質は、図に関連して述べたように融合後定着(cooperation)にて関連的に決定した。第1表は¹²⁵Iで標識したブールヒトIgGの結合を阻止するに必要な抗体のU937細胞に対する濃度を示す。

得られた特異抗体の特異的NP-アケファリン誘導と赤血球(Altmanら、1984年)を凝集する能力は定量的に免疫学的検査法(Toogら、1986年)により測定した。定結果を第2表に示す。μg/mg抗体で凝集した力価は0分後37℃における60%凝集に要する抗体の量を示す。

抗原抗体の数は、NP-Affingel上の次NP抗体を凝集させた後、放射性標識C1qに対する凝集で試験した(LescherbarrowおよびDuck、1984年)。この結果も第2表に示す。

第 2 表

IgG	力価(μg/ml)	親和性αM
Mo1gG2b	9	10
Mo1gM	0.15	-
Mo1gG1	x	-
Mo1gG2bの無関係な変異体		
Pro331-A1a	3	-
Pro331-Gly	-	12
Glu338-A1a	3	12
Thr335-A1a	3	10
Ser337-A1a	3	11
Glu283-A1a	3	-
His285-A1a	3	12
His290-A1a	3	11
Glu294-A1a	3	-
Glu235-A1a	3	-
Lys248-A1a	3	-
Ile253-A1a	3	9
Ser267-A1a	3	-
Asp270-A1a	3	-
Glu274-A1a	3	-
Lys217-A1a	3	-
Lys296-A1a	3	-
Lys340-A1a	3	-

溶菌活性をなくすMo1gG2bの変異体

Glu318-Val	x
Glu318-Ala	x
Lys320-Ala	x
Lys320-Gln	x
Lys322-Ala	x
Lys322-Glu	x
Asn297-Ala	x

溶菌活性を保持するMo1gG2bの変異体

Glu318-Thr	3
Lys320-Arg	3
Lys322-Arg	3

ヒトIgG1およびマウスIgG1に付着する1有する抗体は、各々ニム、ブルグマン博士(M. Br)およびビー・ティ・ジョーンズ氏(P. T. Jones)よりいただいた。

変異体Glu318-Ala、Lys320-Glu、Lys322-Alaは劇的に親和性が減少し、しかしながら、これらはNPハプテンおよびプロラ結合を保持する(Cα2-Cα3インターフェイスで)。このことから、C1q結合の損失は抗体の濾過作用因ではないことが示唆される。例外的に(Glu318-Ala)または過剰の残基(Ile253-Ala)親和性を保持する。

この結果から残基318、320および322により定義された表面パッチは、IgGがC1qと相互に作用するか否かを決定することが示唆される。これらの残基はヒトおよびマウスIgGに高度に保守され、これら3箇所における側鎖の酸性は、補体を活性化しないか、または補体に対する強化された親和性を有するヒトC3b変換の産物体を治療上有用に組み立てるために用い得ることがわかる。

この表面パッチがC1qに対する完全な結合部位である証拠は、Glu×Lys×Lys変異を含むポリペプチド合成品から判明し、該変異はモデル系中のC1q結合を阻止することがわかる。この研究は本出願と同日付にて提出の発明の名称「補体結合ペプチド」として特許係属中のリサーチ・コーポレーションによるPCT出願第 号に記載されている。

本発明は単に説明のために上記のごとく記載されたにすぎず、変異および変異は本発明の範囲を逸脱しない限り可能であることがわかる。

参 考 文 献

アブラムソン、エヌ、ゲルファン、イー、ダブヤンドル、グエイ、エイチ、およびローゼン、エフ (Abramson, N., Gelfand, E.W., Jandl, J.H., et al.), 1970年, J. Exp. Med. 132巻, 1

アンダーソン、シー、エル、およびルーニイ、アイ (Anderson, C.L., and Looney J.), 198 Immunol. Today, 7巻, 264頁

バーネット-フォスター、ディー、イー、ドーキエイ、グエイ、およびペインター、アール、エイチ (Barnett-Forster, D.E., Harrington, K.J., and H.U.), 1980年, J. Immunol. 124巻, 2

ゴードルム (Gaskie et al.), 1975年, No 82巻, 742~749頁

ブルンハウスおよびセラ (Brunhouse and Lehr 379年, Molec. Immun. 16巻, 907~91

バートン (Burton et al.), 1980年, Molec. Immun. 18巻, 1017~1024頁

ーク、アール、ステルンベルグ、エム、ジュイ、イー、お
よびドクエット、アール、エイ、(Burien, D.R., Boyd, J.,
Brantford, A., Satterbrook-Smith, S., Gennet, S.J., &
ovelas, J., Radoscher, T.R., van Senfrendijk, J.R.,
Stiersberg, N.J.B., and Dact, B.A.), 1980年, Nature,
288巻, 338頁

カーター、ピー、ベドール、エイチ、および ウィンタ
ー、ジー、(Carter, P., Bedouelle, H., and Winter, G.),
1985年, Nucleic Acids Res, 13巻, 4451~44
48頁

カーター、ピー、ベドール、エイチ、ウエイ、エム、
ワイ、およびウィンター、ジー、(Carter, P., Bedouelle,
H., Way, M., and Winter, G.), 1986年, in:
Oligonucleotide-site-directed mutagenesis in M13.
Anglian Biotechnology Limited, Colchester, England.

コロンおよびポーター (Colomb and Porter), 1975
年, Biochem J, 145巻, 177~189頁

ダンカン、エイ、アール、(Duncan A.R.), University
of Cambridge Ph.D Thesis (to be published).

エベリトス、エイ、スナック、ディー、ダーバン、エ
イチ、ジョンソン、ピー、およびテイラーパパディミトロ
ー、ジュイ、(Epenetos, A., Snook, G., Durbin, H., Joh
nson, P., and Taylor-Papadimitrakou, J.), 1986年,
Cancer Res, 46巻, 8188頁

レザーバロウ、アール、ジュイ、レイドメイチャー、ティ
ー、グズリュー、チャック、アール、エイ、ウーファ、ジニ
イ、エム、クラーク、エイ、パートン、ディー、アール、
リチャードソン、ボス、およびファンスタン、エイ、
(Leatherbarrow, B.J., Radoscher, T.R., Gek, R.A.,
Boof, J.W., Clark, B., Burton, D.R., Richardson, K., a
nd Feinstein, A.), 1985年, Nucleic Acids, 13巻,
407~415頁

ルイス、ブイ、エイ、ロック、ディー、ブライトナー、
エイチ、およびメルマン、アイ、(Lewis, P.L., Koch, T.,
Plotner, D., and Hoffman, L.), 1983年, Nature,
304巻, 272頁

ルカスら (Lucas et al.), 1981年, J. Immun,
127巻, 2555~2560頁

ムリガン、アール、シー、およびバーク、ピー、
(Mulligan, R.C., and Berg, P.), 1981年, Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 78巻, 2072頁

ニューバーガー、エム、エス、およびウィリアムス、ジー、

ヘイル、ジー、クラーク、エム、およびウエルドマン
エイチ、(Hale, G., Clark, M., and Woldmann, E.), 1
983年, Immunol, 1134巻, 3056頁

ヘイル、ジー、およびウエルドマン、エイチ、(Hale,
and Woldmann, E.), 1985年, in Hybridoma Technolo
gy in the Biosciences and Medicine, T. Springer, ed.
Elsevier Press, New York.

フーバー、エイチ、およびフーテンベルグ、エイチ、エ
イチ、(Huber, H., and Fudenberg, H.H.), 1986年, J
Arch. Allergy Appl. Immunol, 34巻, 18頁

ハックら (Hack et al.), 1985年, Nuc. Acids 9
14巻, 1779~1788頁

アイゼンマンら (Issanen et al.), 1975年, J. Im
114巻, 1728~1729頁

ケイバットら (Kabat et al.), 1980年, "Sequence
of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health
and Human Services.

キョロフ、エイチ、ピー、およびエベネイト、エイ
(Khalafallah, H.P., and Epenetos, A.), 1986年, Curr
Treatment Reviews, 13巻, 249頁

クレイマーら (Kramer et al.), 1982年, Nuc.
Acids Res, 10巻, 8475~8485頁

レザーバロウ およびグック (Leatherbarrow and Gueck),
1984年, Nucleic Acids, 12巻, 321~327頁

イチ、(Kouberger, B.S., Williams, G.T., Mitchell, E.,
Jouhal, S., Flanagan, J.C., and Hobbitts, T.U.),
1986年, Nature, 314巻, 288頁

ニューバーガー、エム、エス、ウィリアムス、ジー、
ー、およびフォックス、アール、オー、(Newberger, M.S.
Williams, G.T., and Fox, R.O.), 1984年, Nature
312巻, 804~808頁

ノリスら (Norris et al.), 1983年, Nuc. Acids
Res, 11巻, 5109~5112頁

オイ、ブイ、ディー、ミナーズ、ディー、ハーデ
アール、アール、レイドラー、ジュイ、ダンズル、リ
イ、エム、ハーゼンベルグ、エム、エイ、およびストラ
(Qi, V.T., Minh-Vuong, T., Hardy, R.H., Reidler, J.,
Pang, J.L., Herzog, L.A., and Stryer, J.), 1984年
Nature, 307巻, 136~140頁

パートリッジ、エム、ジュイ、ワーフ、ジュイ、エム
ジュフェリー、アール、およびパートン、ディー、アール
(Partridge, L.J., Boof, J.W., Jefferies, P., and Burt

(Ravetch, J.V., Luster, A.D., Reinherz, R., Kochan, A., Pavlov, S.I., Portnor, J., Nulenz, J., Pan, Y.W., C., Babelow, J.), 1986年, Science, 234巻, 718頁

サグス, エス, ブイ, ハイローズ, ティー, ミヤケ, ティー, カワシマ, イー, ユイチ, グンソン, エム, ジェイ, イタクラ, ケイ, およびウーレイス, アール, ビー. (Suggs, S.V., Hirose, T., Hirake, T., Kevashina, E.H., Johnson, B.J., Ishida, K., and Vallee, R.B.), 1981年, in: Developmental Biology using Purified Genes (D. Brown, ed.) Academic Press, New York.

ウェルゼンら (Wellstein et al.), 1984年, Molec. Immunol., 21巻, 801頁

ワーフ, ジェイ, エム, ジェファー, エム, アイ, ジェフェリー, アール, およびパートン, ティー, アール.

(Roof, J.M., Jaffar, M.J., Jefferis, B., and Burton, D.R.), 1984年, Molec. Immun., 21巻, 623頁

ワーフ, ジェイ, エム, パトリッジ, エル, ジェイ, ジェフェリー, アール, およびパートン, ティー, アール. (Roof, J.M., Partridge, L.J., Jefferis, B., and Burton, D.R.), 1986年, Molec. Immun., 23巻, 319頁

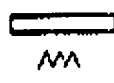
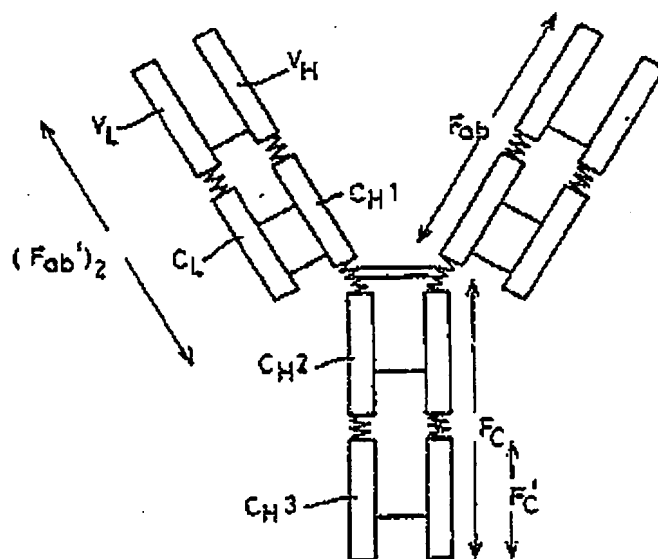
ヤスレーンら (Yaselen et al.), 1976年, J. Immunol., 116巻, 518-522頁

ヤングら (Young et al.), 1986年, Anal. Biochem.

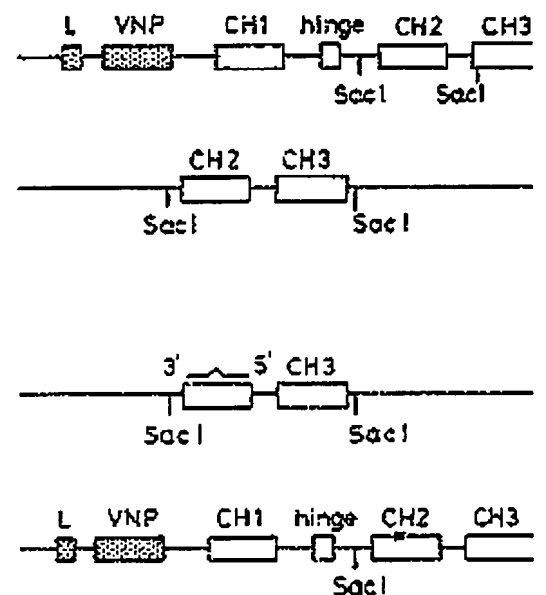
154巻, 649-656頁

ゾラーおよびスミス (Zoller and Smith), 1982, Nuc. Acids Res., 10巻, 6487-6500頁

ゾラーおよびスミス (Zoller and Smith), 1984, DNA, 3巻, 497-488頁



領域
領域間部



[illegible][illegible]

Fig. 3B

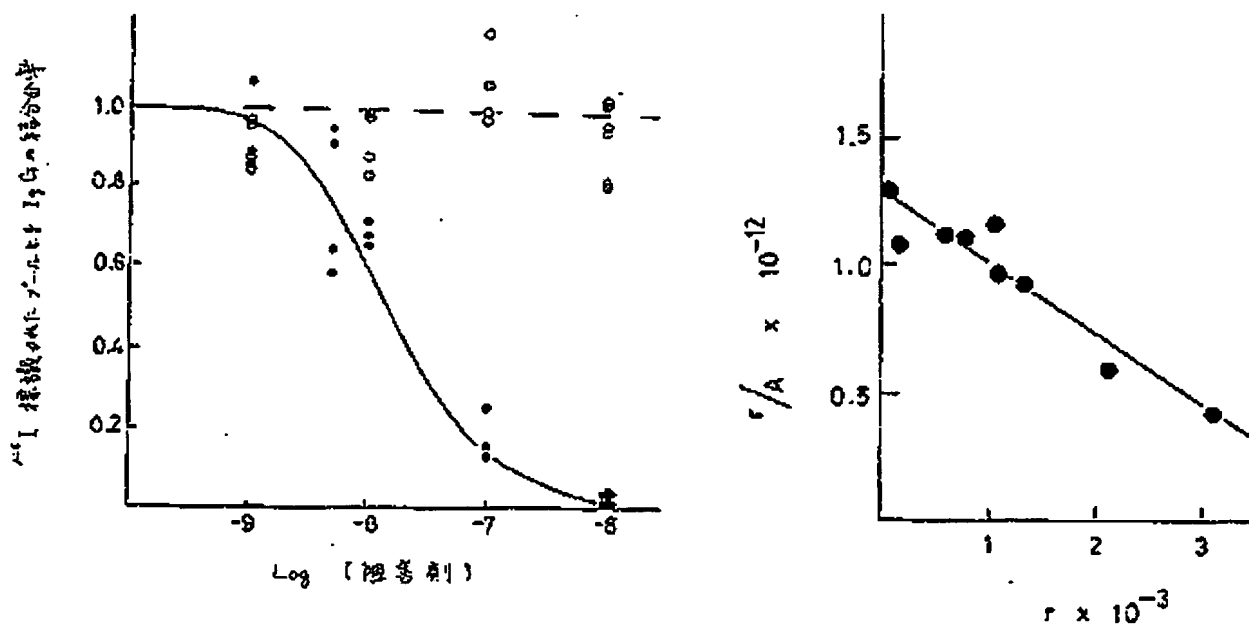


Fig.4

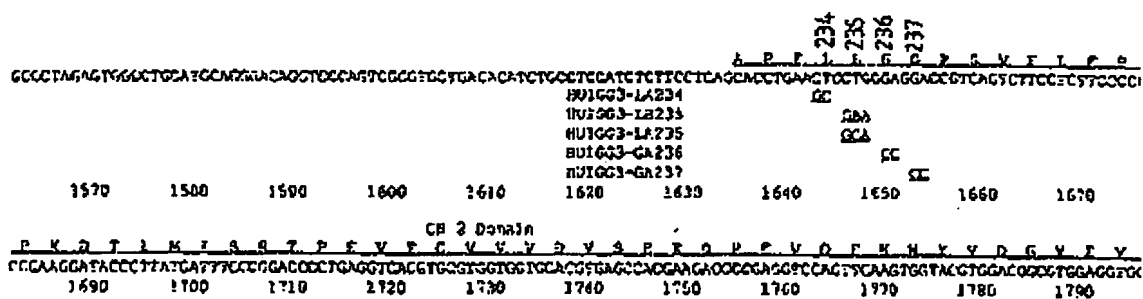


Fig. 6

特表平-5028

国际联盟公告

CCCTGTATGCGCCTAAGCCATGTACGATTCATTCCTCTCTCTCTCTCTCTA

253

LEGOPSEUFIFFPNIKDULN
ACCTCGAGGUTGACGATTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTA
3' GTCCTCTCT

ELTPKUTCUVUUDUSEKDDPDV
TCTCCTTCACACCCATTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTA
GTCCTCTCT 5' 11253-A1a

QISUFVNHUEVHYRDTQYHR
TCTA

297

EDYNSTIRUUSTLP IQHDDH
CAGAGGATTCACACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTA
3' TCTA

318 320 322

233

NSGKEFKCKUNHXDLPSPI
CAGAGGATTCACACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTA
3' TCTA

3' TCTA

3' TCTA

327

ATISKIK
ACAGACCATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTA
3' TCTA

3' TCTA

Fig. 7

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C 12 N 25/20; A 61 K 39/395	
2. FIELD OF INVENTION C 12 N	
3. SUMMARY OF THE INVENTION The present invention relates to a method for the preparation of a...	
4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE PRIOR ART A Immunohistochemistry, volume 11, 1976, Pergamon Press (GB) S. Allan et al.: "Studies on the complement-binding site of rabbit immunoglobulin G-2. Modification of tryptophan residues and their role in the complement activity of rabbit IgG", pages 175-180 A Chemical Abstracts, volume 93, no. 7, 16 August 1980, (Columbus, Ohio, US), J. Vivasco-Martinez et al.: "Chemical modification of carbonyl groups in human IgG: fragments: structural role and effect on the complement fixation", see page 703, abstract 13955t, 5 Mol. Immunol. 1980, 17(3), 329-36 A Chemical Abstracts, volume 99, no. 13, 12 September 1983, (Columbus, Ohio, US), T. Hofstetter et al.: "S-methylations a reversible chemical modification of human immuno-...	
5. CLAIMS 1. A method for the preparation of a... 2. A method for the preparation of a... 3. A method for the preparation of a... 4. A method for the preparation of a... 5. A method for the preparation of a...	
6. INFORMATION CONTAINED IN THE ABSTRACT 17th July 1986	
7. INFORMATION CONTAINED IN THE ABSTRACT 09 AUG 1986	
8. INFORMATION CONTAINED IN THE ABSTRACT M. VAN MO	

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C 12 N 25/20; A 61 K 39/395	
2. FIELD OF INVENTION C 12 N	
3. SUMMARY OF THE INVENTION The present invention relates to a method for the preparation of a...	
4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE PRIOR ART T globulins permitting antineoplastic application. II. Effect on Fe-mediated effector functions", see page 423, abstract 86345v, 5 Vox Sang. 1983, 45(2), 136-48 Meture, volume 132, 7 April 1988, A.R. Duncan et al.: "Localisation of the binding site for the human high-affinity Fe receptor on IgG", pages 563-563	

第1頁の続き

①Int. Cl. 4

識別符号

序内整理番号

C 07 K 15/12
C 12 N 15/00

8318-4H
A-8717-4B

優先権主張

②1987年8月10日③イギリス(CB)④8718897

⑤1987年12月1日⑥イギリス(CB)⑦8728042

⑧発明者

バートン, デニス・レイモンド

イギリス、エス・10、シェフイーールド カーシツク
ド、41